

© Т.Р. Ковригина, В.И. Филимонов, 2010
УДК 611.738.3

Т.Р. Ковригина и В.И. Филимонов

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ ГОЛЕНИ В ПОСТНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ ОНТОГЕНЕЗА

Кафедра анатомии человека (зав. — проф. В.В. Шилкин), Ярославская государственная медицинская академия

Целью исследования было выявление закономерностей постнатального становления системы «двигательное окончание – мышечное волокно (МВ) – сосудистая сеть» в функционально различных мышцах голени интактных белых крыс. Изучены икроножная, подошвенная и камбаловидная мышцы у 72 белых крыс с 14- до 180-суточного возраста. Типирование МВ проводили по активности сукцинатдегидрогеназы и никотинамидадениндинуклеотид-диафоразы. Сочетанным гистохимическим методом выявляли активность холинэстеразы нейромышечного синапса (НМС) (субстрат тиюксусная кислота) и активность щелочной фосфатазы эндотелия сосудов (субстрат нафтол AS–BS-фосфат). Выявлена асинхронность изменений и гетерохронность стабилизации показателей. Наиболее рано (до 30-х суток) стабилизируется диаметр сосудистой сети, количество ферментоактивных зон (ФАЗ) в расчете на одно МВ. К концу 60-х суток стабилизируются гистохимический профиль скелетных мышц. Динамика диаметра МВ и ФАЗ НМС, количества и площади сечений сосудов в расчете на одно МВ имеет периоды интенсивных преобразований (14–30-е сутки), уменьшения (30–60-е сутки) и стабилизации (после 60-х суток) темпов изменчивости. Выявлена связь между уровнем окислительного метаболизма и диаметром МВ.

Ключевые слова: мышечное волокно, сукцинатдегидрогеназа, никотинамидадениндинуклеотид-диафораза, щелочная фосфатаза, холинэстераза.

Общеизвестен факт функциональной, метаболической и гистохимической неоднородности мышечных волокон (МВ) скелетных мышц. Сроки начала и завершения гистохимической дифференцировки мышечных волокон зависят от вида животного (видоспецифичны), исследуемой мышцы (органоспецифичны) и выявляемого фермента (энзимоспецифичны). В постнатальном периоде наблюдается увеличение доли гликолитических и уменьшение содержания оксидативных мышечных волокон [7, 12]. В прямой связи с особенностями метаболизма МВ стоит разная степень их васкуляризации. В скелетных мышцах уровень обменных процессов определяется как ультраструктурой стенки сосудов, так и архитектурой путей микроциркуляции [10]. Именно с характеристикой обменных процессов связывают особенности строения нейромышечного синапса (НМС) и конструкции его ферментоактивной зоны (ФАЗ) [3, 5]. Однако, несмотря на очевидную взаимосвязь в развитии скелетных мышц двигательных окончаний, иннервируемых ими МВ и окружающей их сосудистой сети, работы, посвященные изучению системы всех трех компонентов, отсутствуют.

Цель настоящего исследования — выявить закономерности постнатального становления системы «двигательное окончание — МВ — сосудистая сеть» в функционально различных мышцах.

Материал и методы. Объектом исследования служили мышцы голени интактных белых крыс: медиальная головка быстрой окислительно-гликолитической икроножной мышцы, быстрая гликолитическая подошвенная и медленная окислительная камбаловидная мышца 72 белых беспородных крыс (самки). Исследование проведено в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12. 08. 1977 г. МЗ СССР).

Животных выводили из опыта путем декапитации под нембуталовым наркозом (40 мг/кг) в 14-, 21-, 30-, 60-, 90- и 180-суточном возрасте.

Типирование МВ проводили на основании выраженности гистохимической активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) [6] и никотинамид-адениндинуклеотид-диафоразы (NADH-диафоразы). Сочетанным гистохимическим методом выявляли активность холинэстеразы НМС (субстрат тиюксусная кислота) в модификации [4] и активность щелочной фосфатазы эндотелия сосудов (субстрат — нафтол AS–BS-фосфат) [6], что позволило в пределах среза проследить преобразования ферментоактивной зоны НМС, иннервируемого МВ и окружающей сосудистой сети (рис. 1). МВ по выраженности активности СДГ и NADH-диафоразы подразделяли на волокна с высокой, промежуточной и низкой активностью фермента (рис. 2, 3). Методом прямой морфометрии подсчитывали количество МВ, НМС и сечений сосудов на стандартной площади среза, измеряли диаметр сосудов и МВ.

Методом непрямой морфометрии с помощью окулярной сетки площадью 50 616 мкм² с 912 равноудаленными узлами пересечений определяли площадь сечения ФАЗ НМС и суммарную площадь сечения сосудов на стандартной площади среза. Рассчитывали интегральные показатели: количество и площадь ФАЗ НМС в расчете на 1 МВ; количество и площадь сечения сосудов в расчете на 1 МВ.

Диаметр МВ рассчитывали на основе площади поперечного сечения по формуле: $D = \sqrt{\frac{4S}{\pi}}$, где S — площадь поперечного сечения, найденная по формуле $S = 55,5 \times X$, где X — количество узлов пересечений окулярной сетки, падающих на мышечное волокно; $55,5 \text{ мкм}^2$ — площадь, приходящаяся на один узел пересечений.

Площадь сечения ФАЗ НМС рассчитывали по формуле: $S = 55,5 \times X$, где X — количество узлов пересечений окулярной сетки, падающих на сечение ферментоактивной зоны нейромышечного синапса; $55,5 \text{ мкм}^2$ — площадь, приходящаяся на один узел пересечений.

Распределение значений для всех морфометрических показателей имело нормальный характер. Различия средних величин показателей оценивали по t-критерию Стьюдента с уровнем значимости $P < 0,05$.

Результаты исследования. В 14-суточном возрасте у крыс скелетные мышцы представлены неоднородными по гистохимическим свойствам МВ. В подошвенной и икроножной мышцах преобладали волокна с низкой активностью СДГ ($77,4 \pm 3,0$ и $83,2 \pm 2,2\%$ соответственно). В камбаловидной мышце преобладали волокна с промежуточной активностью фермента ($65 \pm 4\%$). При реакции на NADH-диафорузу во всех трех мышцах преобладали МВ с промежуточной активностью фермента (в подошвенной — $71,6 \pm 1,7\%$, в икроножной — $57 \pm 8\%$, в камбаловидной — $82,2 \pm 0,8\%$).

С 14-х по 60-е сутки после рождения в мышцах отмечено уменьшение доли МВ с низкой активностью СДГ, причем в камбаловидной мышце это сопровождалось увеличением содержания волокон с промежуточной активностью фермента ($91,9 \pm 1,4\%$), в икроножной мышце — увеличением доли волокон с промежуточной ($36,9 \pm 2,3\%$) и высокой ($24,4 \pm 2,0\%$) активностью фермента; в подошвенной мышце — увеличением доли волокон

с высокой активностью фермента ($25,1 \pm 1,0\%$). Изменение спектра МВ, типированных по активности NADH-диафоразы, характеризовалось в подошвенной и икроножной мышцах увеличением количества МВ с низкой активностью фермента при одновременном уменьшении — с промежуточной активностью (до $32,7 \pm 1,3$, $37,8 \pm 2,0\%$ соответственно), в камбаловидной мышце — спектр МВ практически не изменялся. Спектр МВ, типированных по активности СДГ и NADH-диафоразы, после 60-х суток во всех трех мышцах изменялся мало.

При анализе динамики диаметра МВ разных типов выявлена закономерность: наибольшие темпы прироста свойственны МВ, проявляющим наименьшую гистохимическую активность СДГ и NADH-диафоразы, наименьшие темпы — волокнам, проявляющим наибольшую гистохимическую активность ферментов. В целом (табл. 1), МВ с более высокой гистохимической активностью СДГ и NADH-диафоразы имели меньший диаметр и наоборот. МВ с одинаковой гистохимической активностью из исследованных мышц имели наибольший диаметр в камбаловидной мышце.

На 14-е сутки камбаловидная мышца имела наименьший ($5,09 \pm 0,14 \text{ мкм}$) диаметр сосудов ($5,7 \pm 0,3$ и $5,73 \pm 0,24 \text{ мкм}$ в подошвенной и икроножной мышце соответственно), но наибольшие количество и площадь сечения сосудов в срезе, поэтому эти показатели в расчете на 1 МВ превышали значения соответствующих показателей в подошвенной и икроножной мышцах более чем в 2 раза. Диаметр сосудов увеличивался до 30-х суток после рождения и в последующем существенно не изменялся.

Интегральные показатели системы сосудистой сети — МВ характеризовались интенсивным

Таблица 1

Диаметр мышечных волокон с разной активностью сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и NADH-диафоразы ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, мкм)

Активность фермента	Мышца	СДГ		NADH-диафораза	
		14-е сутки	90-е сутки	14-е сутки	90-е сутки
Высокая	Подошвенная	0	$29,0 \pm 0,4$	$13,97 \pm 0,21$	$24,1 \pm 0,3$
	Икроножная	$10,7 \pm 0,4$	$29,2 \pm 0,4$	$12,64 \pm 0,19$	$27,7 \pm 0,5$
	Камбаловидная	$14,12 \pm 0,14$	$30,9 \pm 0,5$	$15,83 \pm 0,21$	$32,6 \pm 0,8$
Промежуточная	Подошвенная	$12,73 \pm 0,22$	$34,5 \pm 0,4$	$15,09 \pm 0,14$	$31,7 \pm 0,3$
	Икроножная	$11,62 \pm 0,19$	$35,3 \pm 0,4$	$13,88 \pm 0,12$	$33,7 \pm 0,5$
	Камбаловидная	$15,28 \pm 0,09$	$36,34 \pm 0,25$	$17,62 \pm 0,12$	$38,1 \pm 0,8$
Низкая	Подошвенная	$13,46 \pm 0,09$	$39,7 \pm 0,4$	$13,1 \pm 1,1$	$40,2 \pm 0,4$
	Икроножная	$11,60 \pm 0,09$	$40,3 \pm 0,4$	$15,71 \pm 0,24$	$38,5 \pm 0,5$
	Камбаловидная	$14,78 \pm 0,21$	0	0	0



Рис. 1. Сосудистая петля в области нейромышечного синапса (НМС) икроножной мышцы 2-месячной крысы.

Стабилизация гистохимической активности холинэстеразы НМС и активности щелочной фосфатазы в эндотелии сосудистой стенки. Сочетанный гистохимический метод выявления холинэстеразы и щелочной фосфатазы. Об. 90, ок. 10.

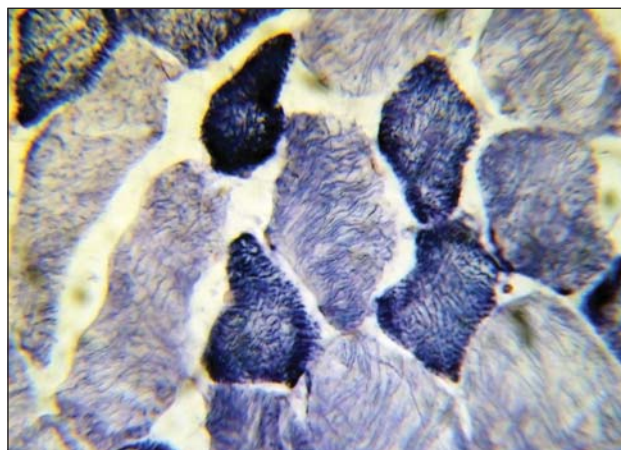


Рис. 3. Мышечные волокна большого диаметра с низкой активностью NADH-диафоразы и волокна малого диаметра с высокой активностью фермента в икроножной мышце 6-месячной крысы.

Гистохимический метод выявления активности NADH-диафоразы в мышечных волокнах. Об. 40, ок. 10.

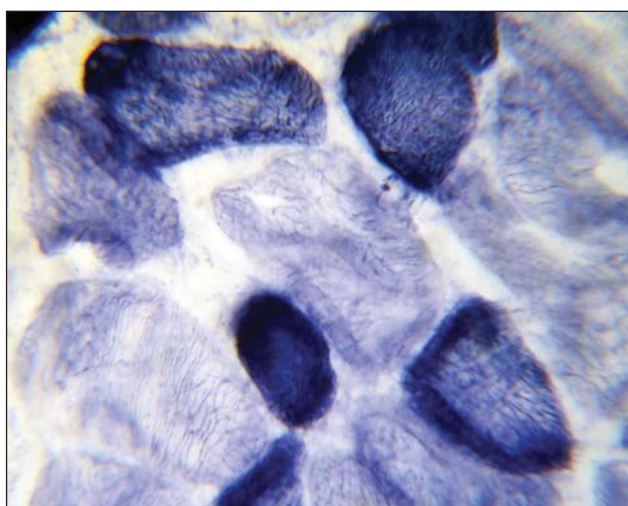


Рис. 2. Мышечные волокна большого диаметра с низкой активностью сукцинатдегидрогеназы и волокна малого диаметра с высокой активностью фермента в подошвенной мышце 6-месячной крысы.

Гистохимический метод выявления активности сукцинатдегидрогеназы в мышечных волокнах. Об. 40, ок. 10.

ростом значений с 14-х по 30-е сутки (табл. 2). В последующий месяц темпы прироста снижались в 3–4 раза, в период с 60-х по 180-е сутки темпы прироста стабилизировались. С возрастом разница в васкуляризации мышц, определяемая количеством и площадью сечения сосудов в расчете на одно МВ, имела тенденцию к уменьшению, но в сопоставимые сроки значения показателей в камбаловидной мышце были всегда значительно больше.

На 14-е сутки на стандартной площади среза камбаловидной мышцы выявлялось наименьшее

количество НМС, вместе с тем, последние со сложной конструкцией ФАЗ имели наибольшую площадь сечения — 123 ± 7 мкм² (92 ± 8 и 105 ± 5 мкм² — в подошвенной и камбаловидной мышце соответственно). Камбаловидная мышца характеризовалась наименьшим количеством и наибольшей суммарной площадью ФАЗ в расчете на одно МВ.

Количество НМС, приходящихся на одно МВ, как и диаметр сосудов, характеризовалось ранним началом периода стабилизации. После 30-х суток постнатальной жизни значение показателей практически не изменялось, тогда как площадь ФАЗ НМС увеличивалась на протяжении всего периода наблюдений.

Обсуждение полученных данных. При исследовании различных по выполняемым функциям и метаболическому профилю скелетных мышц крысы с 14-х по 180-е сутки постнатальной жизни выявлены однонаправленность динамики, неравномерность темпов роста и гетерохронность стабилизации значений морфометрических показателей.

Наиболее рано — с 30-х суток отмечалась стабилизация диаметра капилляров и количества ФАЗ НМС в расчете на одно МВ. Данные литературы о возрастных изменениях диаметра капилляра скелетных мышц противоречивы: по данным одних исследователей значимых изменений нет [1]; по другим — возможно увеличение диаметра [11], третьи — выявляли незначительное уменьшение диаметра [14].

Таблица 2

Темпы прироста (% в месяц) интегральных показателей

Показатель	Мышца	Временной интервал (сутки после рождения)			
		14–30-е	30–60-е	60–90-е	90–180-е
Количество сечений сосудов	Подошвенная	+381,8	+87,5	+13,3	+13,2
	Икроножная	+327,3	+93,1	+35,7	+6,1
	Камбаловидная	+150,0	+59,5	+20,9	+28,4
Площадь сечений сосудов	Подошвенная	+305,9	+68,2	+0,8	+24,6
	Икроножная	+262,9	+56,7	+37,3	+22,0
	Камбаловидная	+67,1	+31,2	+53,5	+45,4
Количество НМС	Подошвенная	–48,3	–7,6	–22,9	–2,8
	Икроножная	–63,8	–1,6	–3,2	–1,1
	Камбаловидная	–46,1	0	–1,6	–7,3
Площадь сечений ФАЗ	Подошвенная	+50,8	+49,1	+16,3	+8,9
	Икроножная	+138,1	+48,6	+30,4	+25,0
	Камбаловидная	+65,7	+55,2	+0,8	+4,0

Примечание. Все показатели даны в расчете на мышечное волокно; НМС — нейромышечный синапс; ФАЗ — ферментоактивная зона.

Несмотря на раннюю стабилизацию диаметра микрососудов, увеличение площади сечения сосудов и их количества на стандартной площади среза продолжалось до 60-х суток, что неизбежно вело к увеличению протяженности капиллярного русла и к смене пространственной архитектоники сосудистой сети с преимущественно линейной на преимущественно многомерную.

Увеличение протяженности капиллярного русла связывают с усилением окислительного метаболизма в органе [1].

В более поздние сроки (60-е сутки) отмечалась стабилизация гистохимической активности ферментов МВ и устанавливался относительно постоянный состав МВ, типированных по активности СДГ и NADH-диафоразы. Гистохимическая активность холинэстеразы субневрального аппарата НМС и активность щелочной фосфатазы сосудистой сети достигали максимального значения и в дальнейшем не изменялись.

На протяжении всего периода наблюдений продолжалось увеличение диаметра МВ, площади ФАЗ НМС, количества и площади сечений сосудов в расчете на одно МВ. Анализ значений этих показателей позволяет выделить период интенсивных преобразований (до 30-х суток), период уменьшения темпов изменчивости (30–60-е сутки) и относительной стабилизации темпов роста (90–180-е сутки).

Анализ диаметра МВ выявил связь с уровнем окислительного метаболизма. Диаметр МВ с высокой активностью ферментов во все сроки исследования меньше, чем с промежуточной и низкой активностью, что согласуется с данными других исследователей [7]. После рождения число

МВ в мышцах с увеличением возраста животного не изменяется; приспособление к новым условиям деятельности мышц идет путем изменения размеров, расположения и группировки уже существующих волокон [15]. Увеличение диаметра МВ обычно связывают с возрастанием числа миофибрилл и других органелл [2].

Камбаловидная мышца с ранних сроков отличалась особенностью гистохимического спектра МВ, отражающего окислительный характер метаболизма мышцы, что сопровождалось высокими показателями васкуляризации и особенностью ферментоактивной зоны НМС (низкое количество ФАЗ в расчете на одно МВ и большая площадь НМС со сложной ФАЗ). Большой диаметр МВ камбаловидной мышцы в ранние сроки можно объяснить ранней функциональной активностью мышцы как антигравитационной [13].

Таким образом, развитие МВ скелетной мышцы обуславливается многими факторами: процессами роста МВ, сосудистой сети и спецификой субневрального аппарата в области НМС.

Параллельно с ростом диаметра МВ, независимо от вида мышцы, происходят дифференцировка ФАЗ и увеличение ее размерных показателей. При этом подтверждается предположение о сопряженности между диаметром МВ и ферментоактивной зоной НМС [9]. Одновременно происходит дифференцировка МВ, и увеличивается контактная поверхность сосудистой сети.

Вместе с тем, все эти структуры изменяются гетерохронно: в ранние сроки (30 сут) стабилизируются диаметр сосудистой сети, количество ФАЗ в расчете на одно МВ. Последнее, очевидно, связано с завершением ранней возрастной элими-

нации НМС [3, 5]. К концу 60-х суток устанавливается гистохимический профиль скелетных мышц. Еще позднее (после 90-х суток) стабилизируются темпы прироста диаметра МВ и ФАЗ НМС. Это не означает, что постнатальное развитие скелетной мышцы заканчивается: параллельно с продолжающейся функциональной специализацией скелетных мышц постепенно нарастают возрастные денервационные изменения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Голубь А.С. и Брод В.И. Возрастные изменения параметров капиллярного кровотока в скелетной мышце: Аллометрические зависимости и гипотеза функциональной длины капилляра. Физиол. журн. им. И.М. Сеченова, 1993, т. 79, № 4, с. 43–52.
2. Данилов Р.К. Гистогенетические основы нервно-мышечных взаимоотношений. СПб., Б.и., 1996.
3. Ковригина Т.Р. и Шилкин В.В. Постнатальная дифференцировка ХЭ-позитивных зон НМС некоторых мышц голени белой крысы. Морфол. ведомости, 2002, № 1–2, с. 148–151.
4. Николаев Г.М. и Шилкин В.В. Опыт определения активности ацетилхолинэстеразы в структурах периферической нервной системы. В кн.: Проблемы морфогенеза периферических нервов. Ярославль, изд. Ярославск. мед. ин-та, 1983, с. 64–72.
5. Огнетов С.Ю., Сабельников Н.Е. и Чучков В.М. Нейромышечный синапс: органная характеристика, возрастные преобразования. Ижевск, Изд-во Ин-та экономики и управления УдГУ, 2002.
6. Пирс Э. Гистохимия. М., Изд-во иностр. лит-ры, 1962.
7. Рехачева И.П., Катинас Г.С. и Сапронова И.Н. Изменение активности сукцинатдегидрогеназы в мышечных волокнах функционально различных мышц крыс после снижения силовой нагрузки — гиподинамии. Арх. анат., 1985, т. 89, вып. 9, с. 49–55.
8. Сабельников Н.Е., Милёхина Н.В. и Шамшурина И.В. Преобразование ферментоактивных зон скелетных мышц различного происхождения. Морфология, 2004, т. 125, вып. 3, с. 24–27.
9. Шилкин В.В. и Филимонов В.И. Зависят ли размеры и форма нейромышечного синапса от диаметра мышечного волокна. Росс. морфол. ведомости, 1996, № 2(5), с. 135–139.
10. Desaki J. and Nishida N. A further observation of the structural changes of microvessels in the extensor digitorum longus muscle of the aged rat. J. Electron Microsc. (Tokyo), 2007, v. 56, № 6, p. 249–255.
11. Gray S.D. Morphometric analysis of skeletal muscle capillaries in early spontaneous hypertension. Microvasc. Res., 1984, v. 27, № 1, p. 39–50.
12. Philippi M. and Sillau A.H. Oxidative capacity distribution in skeletal muscle fibers of the rat. J. Exp. Biol., 1994, v. 189, p. 1–11.
13. Riley D.A., Ilyina-Kakueva E.I., Ellis Bain S.J.L. et al. Skeletal muscle fiber, nerve and blood vessel breakdown in space-flown rats. FASEB J., 1990, v. 4, № 1, p. 84–91.
14. Sarelius I.H., Damon D.N. and Duling B.R. Microvascular adaptation during maturation of striated muscle. Amer. J. Physiol., 1981, v. 241, № 3, p. 317–324.
15. Timson B.F. and Dudenhoefter G.A. Skeletal muscle fiber number in rat from youth to adulthood. J. Anat., 1990, v. 173, p. 33–36.

Поступила в редакцию 19.08.09
Получена после доработки 24.03.10

DIFFERENTIATION OF CALF SKELETAL MUSCLES IN THE POSTNATAL PERIOD OF ONTOGENESIS

T.R. Kovrigina and V.I. Filimonov

The aim of the present investigation was to detect the regularities of postnatal development of «motor end-plate–muscle fiber (MF)–vascular network» system in different calf muscles of intact albino rats. Gastrocnemius, plantaris and soleus muscles were studied in 72 albino rats aged from 14 to 180 days. Identification of MF type was performed on the basis of succinate dehydrogenase and NADH-diaphorase activity. Cholinesterase activity of the neuro-muscular synapse (NMS) and alkaline phosphatase activity in the vascular endothelium were demonstrated using a combined histochemical method. The diameter of vascular network and the number of enzyme-active zones (EAZ) per one MF were the earliest parameters to be stabilized (before day 30). Histochemical profile of skeletal muscle was stabilized by the end of day 60. Dynamics of MF diameter and EAZ in NMS, vessel diameter and numbers per one MF is characterized by the periods of active changes (days 14–30), decrease (days 30–60) and stabilization (after day 60) of variance rate. The association between the level of oxidative metabolism and MF diameter was demonstrated.

Key words: muscle fiber, succinate dehydrogenase, NADH-diaphorase, alkaline phosphatase, cholinesterase.

Department of Human Anatomy, Yaroslavl State Medical Academy